



TITLE:

The spectral properties and the reaction mechanism of pyrocatechase(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kojima, Yutaka

CITATION:

Kojima, Yutaka. The spectral properties and the reaction mechanism of pyrocatechase. 京都大学, 1966, 医学博士

ISSUE DATE:

1966-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/211770>

RIGHT:

氏 名	小 島 豊 こ じ ま ゆたか
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 博 第 246 号
学位授与の日付	昭 和 41 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	The spectral properties and the reaction mechanism of pyrocatechase (ピロカテカーゼの分光学的性質とその反応機構について)
論 文 調 査 委 員	(主 査) 教 授 早 石 修 教 授 山 田 肇 教 授 島 本 暉 朗

論 文 内 容 の 要 旨

酸素添加酵素は、分子状酸素を有機物中にとりこみ、核開裂反応や水酸化反応を行なう一群の酵素で、アミノ酸代謝、ホルモン、ビタミンの生合成はじめ種々の生理的に重要な反応に関与している。しかしながら従来、純粋酵素を大量精製することが難かしく、その酵素反応機構の詳細については不明の点が多かった。

ピロカテカーゼは、カテコールを分解して、シス、シスームコン酸を生ずる反応を触媒する酸素添加酵素である。その酵素化学的性質や、分子量が約80,000の蛋白で1分子中に2原子の鉄を含むことなどが報告されている。著者は純度の高い本酵素を大量に精製したところ、他の酸素添加酵素と異なり、著明な赤色を有していることを認め、この可視部吸収及びその変化を追究するこりにより、酸素添加酵素の反応機構を研究した。

まず本酵素を大量含む菌株、Pseudomonas arvilla を土壌中より分離し、その音波破碎液より酵素を精製した。精製酵素の比活性は29.6で、従来もっとも精製された酵素標品より更に1.5倍精製されており、超遠心的、電気泳動的挙動より、均一な蛋白とみなされた。

この酵素の中性乃至弱アルカリ性溶液は赤色を呈し、440m μ に極大吸収を、390m μ より 650m μ にかけて広範な吸収をもっている。本酵素は鉄以外の補酵素を含有していないため、可視部吸収は非ヘム鉄と蛋白のアミノ酸残基との結合に由来するものと考えられる。この鉄は三価鉄のキレート剤であるタイロンと反応して三価鉄キレートの色を示し、この色の強さの増加と平行して酵素活性が減少した。一方二価鉄のキレート剤では酵素反応は阻害を受けなかった。酵素を還元すると褪色し、それを酸化するともとの赤色へもどった。

更に可視部吸収と酵素活性との関係を検討した。酵素を 4°C に放置すると徐々に失活していくが、それと共に可視部吸収が減少し、最後に無色の活性のない蛋白となった。同様の現象は酵素溶液の pH の変化、蛋白変性剤の添加、熱処理等によってもおこりいずれの場合も活性の減少と吸収の減少とは比例し

た。これらの事実は本酵素中の三価鉄が可視部吸収の原因であり活性の発現に重要な役割をもつことを示している。

この酵素に基質カテコールを嫌氣的条件下で加えると $710m\mu$ の吸収が増大し肉眼的にも灰青色を呈した。これに酸素を通じると、酸素添加反応が起り、すべてのカテコールがシス、シスームコン酸に変化してしまうと、酵素はもとの赤色にもどった。同様の变化はカテコールと同じく基質となるクロルカテコールやメチルカテコールによっても認められ、基質となり得ない他の類似化合物では認められなかった。この変化はピロカテカーゼとカテコールの結合した、一種の酵素基質複合体を観察したものと考えられる。

以上の結果より次のような反応機構を考えた。即ちピロカテカーゼは活性中心に三価鉄を有し、それ由来すると考えられる赤色を呈している。まず基質であるカテコールが酵素分子中の三価鉄と結合し、灰青色を呈する一種の酵素基質複合体をつくる。ついでもう一つの基質である酸素が活性化され、カテコールと酸素とが反応してシス、シスームコン酸を生ずる。それと共に酵素はもとの状態にもどり、次の反応が始まる。この反応機構は、ピロカテカーゼの特徴である分光学的性質を追究することによって解明されたものであるが、他の諸性質をも矛盾なく説明することができた。

本報ではピロカテカーゼの吸収スペクトルとその変化を中心に酵素の精製、分析的、酵素化学的性質を述べ、酵素反応機構を論じた。

論文審査の結果の要旨

酸素添加酵素は、重要な生理的意義を有するにもかかわらず、純粋な酵素を大量に精製することが困難であるため、その反応機構についてはじゅうらい不明の点が多かった。

著者は酸素添加酵素の一つであるピロカテカーゼの大量精製に成功し、その純粋標品が可視部に著明な吸収を示すことを認め、この吸収と酵素作用との関係を検討し、反応機構を解明しようと試みた。

まず、本酵素の分子量、鉄含量、酵素化学的性質を調べ、キレート剤による実験によって、本酵素中に含まれている三価鉄が酵素活性の発現に重要な役割を持つことを証明した。ついでこの可視部吸収の強さは酵素活性に比例すること、吸収の減少は同時に活性の低下をきたすことを発見した。さらに嫌氣的条件下で、本酵素に基質を添加することにより基質・酵素複合体と思われるものを観察し、以上の結果を基礎にピロカテカーゼの反応機構を考察している。

これらは、酸素添加反応の一般的な反応機構を考える上に貢献したのみならず、生体における酸素活性化の機作を研究する上で寄与する点が多いものと考えられる。

このように、本研究は学術上有益であり、医学博士の学位論文として価値あるものと認定する。